

# **Komplex soksejtű struktúrák genetikai hátterének és makro-evolúciójának vizsgálata termőtest képző gombákon (Agaricomycetes)**

Doktori (Ph.D.) értekezés tézisei

Varga Torda

Témavezető: Dr. Nagy László

Szintetikus és Rendszerbiológiai Egység, Biokémiai Intézet,  
Szegedi Biológiai Kutatóközpont

Biológia Doktori Iskola, Természettudományi és Informatikai  
Kar, Szegedi Tudományegyetem



Szeged

2020

## Bevezetés

A többsejtű szervezetek minden biogeográfiai régióban megtalálhatóak, és az ökoszisztémában rendkívül fontos funkciókat töltenek be. Az egyszerű soksejtű organizmusok aggregátumokat vagy kolóniákat alkotnak, és mind prokarióta, és eukarióta leszármazási vonalakon legalább 25-ször egymástól függetlenül megjelentek. Ezzel szemben a komplex soksejtűség, ahol háromdimenziós struktúrák fejlődnek, és csak sejteik egy része érintkezik közvetlenül a környezettel, kizárólag öt eukarióta csoportban jelent meg, amelyekből három a jelenlegi szárazföldi ökoszisztémák meghatározó eleme: állatok, szárazföldi növények és gombák. A Földön a komplex soksejtűség elterjedtsége ellenére a komplex soksejtű szervezetek evolúciójának mozgatórugója és genetikai háttere nem teljesen ismert. A gombák országa (Fungi) kivételes helyzetben van a komplex soksejtű csoportok között, mivel itt a komplex soksejtűség legalább nyolcszor konvergens módon alakulhatott ki. Valószínűleg a legelterjedtebb komplex soksejtű gombastruktúrák az ivaros termőtestek, amelyek elsődleges célja a meiotikus spórák előállítása egy védett környezetben és a spórák terjesztésének a megkönnyítése.

Az Agaricomycetes osztály, más néven a termőtest képző gombák osztálya, több mint 20 000 fajt tartalmaznak, amelyek túlnyomó része komplex termőtesteket hoznak létre. Ezért ennek az

osztálynak a filogenetikai összehasonlító módszerekkel történő vizsgálata jelentősen megnövelné ismereteinket a komplex morfológiai struktúrák makro-evolúciójáról.

Az elmúlt években tett számos kutató erőfeszítése ellenére a termőtest-fejlődés genetikai háttere még mindig kevésbé ismert. Az egyik legjobban vizsgált gomba a *Coprinopsis cinerea* modell organizmus, ami szaprotróf életmódot folytat, laboratóriumi körülmények között könnyen termeszthető és gyors (1-2 hét) életciklussal rendelkezik. A *C. cinerea* genomja már egy évtizede ismert, és azóta számos információ gyűlt össze erről a gombáról. Azonban, továbbra sem világos, hogy hogyan kezdenek fejlődni a fő szövettípusok, és melyek azok a gének, amelyeknek szerepük van a *C. cinerea* fejlődésének kezdetén.

## Célkitűzések

Célul tűztük ki a gombák országának egyik legnagyobb osztályának, a termőtest képző gombáknak (Agaricomycetes) makro-evolúciójának vizsgálatát. Meg akartuk vizsgálni a termőtestek és az ezekhez kapcsolódó morfológiai struktúrák, például a kalap, az általános vagy részleges burok és a spóratermő réteg evolúcióját. Ezenkívül szeretnénk volna megvizsgálni azokat a géneket, amelyek szerepet játszanak a termőtest és annak fő szövettípusainak kialakulásában. Ezért egy RNS szekvenálási módszert dolgoztunk ki, amiben krio-mikrotómos metszetekből lézer mikrodisszekciós technikát használva a *C. cinerea* kora fejlődése során, hét fejlődési állapot és kilenc szövettípus transzkriptom adatát vizsgáltuk. A következő kérdésekre szeretnénk volna választ adni:

1. Milyen ütemben alakultak vagy haltak ki fajok a termőtest képző gombák evolúciója során?
2. Volt-e hirtelen, esemény-szerű változás a fajképződési vagy a kihalási rátában, amely kulcs-innovációs vagy tömeges kihalási eseményekre utalhat?
3. Ha igen, kapcsolódhat-e morfológiai jellegekhez?

4. Bizonyos morfológiai jelek növelhetik-e a fajok diverzifikációs rátáját? Ezt a kérdést hat jelleg kapcsán tettük fel: kalap képzés, a spóra termőréteg felület növelése, zártan történő fejlődés, az általános vagy a részleges burok jelenléte.
5. Milyen gének expresszálódnak a *Coprinopsis cinerea* fejlődése során a vegetatív micélium és az elsődleges/másodlagos hifacsomó átmenet során?
6. Felismerhetők-e a hifális növekedési mintázat megváltozása a termőtest fejlődés során vizsgált transzkriptom szintjén?
7. A védelemmel és a sejt felszín impregnálással kapcsolatos gének jellemzőbbek-e a kalapra, az általános vagy részleges buokra, mint más szövetekre?
8. Melyek a szövet specifikus gének és mikor jelentek meg az evolúció során?

## Felhasznált módszerek

- „Maximum Likelihood” (ML) filogenetikai fa becslés (RAxML), a filogenetikai fák kétlépcsős Bayes-féle molekuláris óra kalibrálása (PhyloBayes, FastDate). A filogenomikai adatok Bayes-féle vagy „rate smoothing” óra kalibrálása (mcmcree, illetve r8s).
- Diszkrét morfológiai jellegek evolúciójának modellezése: Mk modellek BayesTraits programban implementálva
- Parszimónia és sztochasztikus karakter-térképezés alapú ősi karakterállapot rekonstrukciós elemzések
- Karakter állapot független diverzifikációs ráta elemzés (BAMM)
- Karakter állapot függő diverzifikációs ráta elemzések (BiSSE és MuSSE)
- Szövetspecifikus RNS szekvenálási könyvtárak előállítás
  - Krio-hisztológiai módszerek alkalmazása
  - Lézer mikrodisszekciós módszer alkalmazása
  - Nagy érzékenységű RNS szekvenálási módszerek
- „Read” illesztés és minőségellenőrzés: STAR RNA-seq illesztő program, FastQC program, BMap csomag, EDaseq csomag.
- RNS expresszió elemzés negatív binomiális (NB) általánosított lineáris modellel (GLM) használatával: DESeq2 csomag, független hipotézis-súlyozás (IHW), GO, IPR, KOG

funkcionális kifejezés dúsulás elemzések topGO csomag és hipergeometrikus teszt alkalmazásával.

- Genomikai filoztratigráfiai elemzés

## **Eredmények összefoglalása**

### **Robusztus filogenetikai fák és kronogrammok előállítása az Agaricomycetes osztályra nézve**

Összeállítottunk egy 5284 fajt és három genomi lókuszt (nrLSU, rpb2, tef1- $\alpha$ ) tartalmazó széles földrajzi lefedettséggel rendelkező adatsort az Agaricomycetes osztályra nézve. Ennek az adatsornak a felhasználásával végeztünk el maximum likelihood (ML) filogenetikai fa becsléseket, ami során a fő topológiát (törzsfa gerincét) fixen tartottuk, egy 105 fajt tartalmazó filogenomikai fa paramétereit alkalmazva. Összesen 245 ML fát készítettünk, amelyek az Agaricomycetes filogenetikai topológiai változatosságát teljes mértékben lefedték a Robinson-Foulds páros távolságok elemzése alapján. Tíz fa molekuláris óra kalibrálását is elvégeztük, amelyet rétegzett véletlenszerű mintavétellel választottak ki hogy megfelelően reprezentálva legyen a 245 fa topológiai sokfélesége. A molekuláris óra kalibrálást két-lépcsős Bayes-féle elemzésekkel végeztük, amelynek eredményeként tíz kronogramot kaptunk.

### **Az Agaricomycetes leszármazási vonalak diverzifikációja a Jura időszakban hirtelen megnőtt**

Megbecsültük a leszármazási vonal specifikus fajképződési és kihalási rátákat az Agaricomycetes osztályon belül, majd



összegeztük a nettó diverzifikációs rátákat (fajképződési ráta és a kihalási ráta különbsége) az idő tengely mentén. Megállapítottuk, hogy a nettó diverzifikációs ráta hirtelen növekedésnek indult ami a Jura korra volt tehető (200-145 millió évvel ezelőtt).

### **A tömeges kihalási események másképp érintették az Agaricomycetes fajokat, mint egyéb organizmusokat**

A karakter független diverzifikációs elemzéseink során detektáltunk egy kis mértékű növekedést a leszármazási vonalak nettó kihalási rátájában. Ezért a CoMET modell segítségével tovább vizsgáltuk, hogy történhetett-e tömeges kihalás az Agaricomycetes evolúciója során. Ez az elemzésünk is támogatta egy kihalási esemény jelenlétét a Jura kor végén, de érdekes módon a Kréta-Paleogén (K-Pg) határán nem volt detektálható tömeges kihalásra utaló jel. Ezért a termőtest képző gombák valószínűleg nem mentek keresztül tömeges kihaláson a K-Pg határán, szemben más élőlényekkel, ahol a fajok legalább 75% kihalt.

### **A megnövekedett diverzifikációs ráta egybevág a komplex termőtest morfológiák megjelenésével**

A diverzifikációs ráta elemzések során esemény szerű, szignifikáns változásokat is detektálunk a diverzifikációs rátában. Összességében 85 szignifikáns diverzifikációs változást detektáltunk, amiből 57, olyan kládok őséiben történt ahol kizárólag

kalapos morfológiájú fajok alkották a csoportot. Továbbá elvégeztünk egy ősi karakterállapot rekonstrukciót a főbb termőtesttípusokra nézve, és azt tapasztaltuk, hogy a komplex morfológiák (kalapos, gaszteroid, koralloid) a Jura korban fejlődtek ki, ami után a kalapos morfológiával rendelkező leszármazási vonalak aránya megnövekedett az Agaricomycetes csoportok között. Ezek az eredmények arra engedtek következtetni, hogy a termőtestek rendelkezhetnek bizonyos morfológiai jellegekkel, amelyek előnyösek lehetnek a fajok számára. Ezért, öt morfológiai jelleget vizsgáltunk karakter állapot függő diverzifikációs elemzésekkel. Megállapítottuk, hogy a kalap jelenléte, a zártan történő fejlődés, az általános vagy a részleges burok jelenléte, valamint a spóra termőréteg felület növelése pozitívan hatott a fajok diverzifikációs rátájára.

### **Nagy felbontó képességű szövet-specifikus RNS szekvenálási módszer kidolgozása**

Ahhoz, hogy nagyobb betekintést nyerjünk a termőtest fejlődés genetikai hátterébe egy nagy felbontóképességű szövet-specifikus RNS szekvenálási módszert dolgoztunk ki. Először több mint 200 krio-hisztológiai vizsgálat elvégzésével tanulmányoztuk a *C. cinerea* korai fejlődését és szövet képzését. Ezután kidolgoztunk egy RNS-szekvenálást amit lézer mikrodisszekciós technikával (LCM) kombináltunk és számos eljárás módosításával

adaptáltuk *C. cinerea* modell gombára. Kilenc szövettípust és hét fejlődési stádiumot választottunk ki a *C. cinerea* korai fejlődésnek transzkriptomikai vizsgálatára, és 84 cDNS könyvtárat állítottunk elő, amelyek az összes szövettípust lefedve 2-4 biológiai ismétlést tettek lehetővé.

### **A komplex soksejtűség kialakulásában szerepet játszó gének detektálása (a vegetatív micélium – hifa csomó átmenet vizsgálata)**

Először differenciális génexpressziós elemzéseket végeztünk a vegetatív micélium és a hifa csomó fejlődési állapotok között, hogy a termőtest fejlődés első lépéseiben szerepetjátszó géneket megvizsgáljuk. Az elsődleges és a másodlagos hifa csomók szöveteiben 1293 – 2590 felülregulált gént detektáltunk. Megállapítottuk, hogy a sejtsztódásban és a sejtfa szerkezet módosításában szerepet játszó gének feldúsultak ezekben a szövetekben, és kulcsfontosságúak lehetnek a vegetatív micéliumból a komplex többsejtű hifa csomóba történő átmenetben. Összességében 161 felülregulált gént találtunk az első két fejlődési szakaszban, amelyek összefüggésbe hozhatók a sejtsztódással és a hifa növekedési mintázat szabályozásával, beleértve a ciklineket, a STRIPAK fehérjéket és a szeptineket. Megállapítottuk, hogy ezeknek a géneknek a száma az első fejlődési állapotok során megnőtt. Továbbá detektáltunk 112, a

sejtfal biogenezisével és átalakításával kapcsolatos, felül szabályozott gént is, köztük 75 feltételezett glikozid-hidroláz (GH) aktivitású gént.

### **Szövet-specifikus gének detektálása**

Szövet-specifikus gének detektálása során olyan géneket azonosítottunk egy adott szövetben, amely szignifikánsan magasabb génextpressziót mutatott, mint az adott stádium összes szövetének átlagos expressziója. Jelen munkában azokra a morfológiai jellegekkel kapcsolatos szövetekre összpontosítottunk, amelyek pozitívan befolyásolták a fajok diverzifikációs rátáját a makro-evolúciós elemzéseink alapján. Összesen 2053, 1053, 1260 és 941 felülregulált gént detektáltunk az általános burok, részleges burok, a kalap, illetve lemezek szöveteiben. Feltételeztük, hogy az általános burok, a részleges burkok illetve a kalap egyik fő funkciója a fejlődő priordium védelme. A manuálisan összegzett funkcionális annotációs listák alapján azt találtuk, hogy a védelemmel kapcsolatos gének az általános burok és kalap szöveteiben nagyobb arányban találhatóak, mint a részleges burokban vagy a lemezben. Továbbá számos védelemben szerepet játszó gén olyan mintázatot mutatott, amely a környezethez közeli szövetekben magas expresszióval rendelkezett.

## **A szövet-specifikus gének evolúciójában mind a genetikai predispozíció, mind a fiatal gének megjelenése szerepet játszhatott**

Vizsgálataink során megpróbáltuk feltárni a fenotípusos és genetikai evolúció kapcsolatát a szövet-specifikus gének konzerváltság szintjének filoztratigráfiai elemzésével. Megállapítottuk, hogy a szövet-specifikus gének nagy része Dikarya vagy alacsonyrendű gomba- és eukarióta ősökben fejlődött ki. Ez azt jelenti, hogy a szövet-specifikus gének megjelenése megelőzte a komplex morfológiai struktúrák és a szövetek evolúcióját és ezek a gének más életfolyamatokban láthattak el funkciókat. Ez alól kivételt képzett egy általános burok specifikus géncsoport, amely a Marasmioid-klád ősében alakulhatott ki. Érdekes módon az általunk készített kronogrammok alapján a Marasmioid klád a Jura időszakban alakulhatott ki. Eredményeink összességében azt sugallják, hogy a *C. cinerea* fenotípusos evolúcióját főként ősi és részben fiatal gének alakították.

## Publikációs lista

MTMT azonosító: 10049246

### A doktori eljárás alapját képező 2 db közlemény

Varga T., Krizsán K., Földi C., Dima B., Sánchez-García M., Sánchez-Ramírez S., ... Nagy LG. 2019. **Megaphylogeny resolves global patterns of mushroom evolution.** *Nature Ecology & Evolution*, 3, 668–678. doi: <https://doi.org/10.1038/s41559-019-0834-1>. IF: 12,541

Nagy LG., Varga T., Csernetics Á., Virágh M. 2020. **Fungi took a unique evolutionary route to multicellularity: Seven key challenges for fungal multicellular life.** *Fungal Biology Reviews*, xxxx. <https://doi.org/10.1016/j.fbr.2020.07.002>. IF: 4,806

**Referált folyóiratban megjelent közlemények [Impakt faktorok összege: 54,42]**

Nagy LG., Varga T., Csernetics Á., Virágh M. 2020. **Fungi took a unique evolutionary route to multicellularity: Seven key challenges for fungal multicellular life.** *Fungal Biology Reviews*, xxxx. <https://doi.org/10.1016/j.fbr.2020.07.002>. IF: 4,806

Kiss E., Hegedüs B., Virágh M., Varga T., Merényi Zs., Kószó T., Bálint B., Prasanna NA., Krizsán K., Kocsubé S., Riquelme M., Takeshita N., Nagy LG. 2019. **Comparative genomics reveals the origin of fungal hyphae and multicellularity.** *Nature Communications*, 10(1), p. 4080. doi: 10.1038/s41467-019-12085-w. IF: 12,121

Varga T., Krizsán K., Földi C., Dima B., Sánchez-García M., Sánchez-Ramírez S., ... Nagy LG. 2019. **Megaphylogeny resolves global patterns of mushroom evolution.** *Nature Ecology & Evolution*, 3, 668–678. doi: <https://doi.org/10.1038/s41559-019-0834-1>. IF: 12,541

- Zajta E., Varga T., Kovács MG., Dima B. 2019. **New insights on *Hygrophorus penarioides* and *H. penarius* (Agaricales, Hygrophoraceae) from Hungary.** *Phytotaxa*. 392(2): 127-139. doi: <http://dx.doi.org/10.11646/phytotaxa.392.2.2>. IF: 1,007
- Sipos G. ... Varga T. ... Nagy GL. 2017. **Genome expansion and lineage-specific genetic innovations in the forest pathogenic fungi *Armillaria*.** *Nature Ecology & Evolution*, 1(12), pp. 1931–1941. doi: 10.1038/s41559-017-0347-8. IF: 10,965
- Merényi Zs., Varga T., Hubai AG, Pitlik P., Erős Á., Trappe MJ, Bratek Z. 2017. **Challenges in the delimitation of morphologically similar species: a case study of *Tuber brumale* agg. (Ascomycota, Pezizales).** *Mycological Progress*. 16 (6): pp. 613-624. doi:10.1007/s11557-017-1296-y. IF: 1,914
- De la Varga H., Le Tacon F., Lagouet M., Todesco F., Varga T., Miquel I., Barry-Etienne D., Robin C., Halkett F., Martin F., Murat C. 2017. **Five years investigation of female and male genotypes in Périgord black truffle (*Tuber melanosporum* Vittad.) revealed contrasted reproduction strategies.** *Environmental Microbiology*. 19(7): 2604-2616. doi: 10.1111/1462-2920.13735. IF: 4,974
- Merényi Zs., Varga T., Bratek Z. 2016. ***Tuber brumale*: A Controversial Tuber species.** In Zambonelli A., Iotti M., Murat C. (Eds.), True Truffle (Tuber spp.) in the World. Soil Biology, Springer International Publishing. pp.:49-68. doi: 10.1007/978-3-319-31436-5\_4
- Kutszegi G., Siller I., Dima B., Takács K., Merényi Zs., Varga T., Turcsányi G., Bidló A., Ódor, P. 2015. **Drivers of macrofungal species composition in temperate forests, West Hungary: functional groups compared.** *Fungal Ecology*, 17: 69–83. doi: <http://doi.org/10.1016/j.funeco.2015.05.009>. IF: 2,631
- Varga T., Merényi Zs., Bratek Z., Solti Á. 2014. **Mycorrhizal colonization by *Tuber aestivum* has a negative effect on the vitality of oak and hazel seedlings.** *Acta biologica Szegediensis* 58(1):49-53.
- Merényi Zs., Varga T., Geml J., Orczán Á. K., Chevalier G., Bratek Z. 2014. **Phylogeny and phylogeography of the *Tuber brumale* aggr.** *Mycorrhiza* 24(1): 101-113. doi:10.1007/s00572-014-0566-7. IF: 3,459

- Varga T., Hegyessy G., Merényi Zs., Szegedi Zs., Bratek Z. 2013. **Hypogeous fungi of Hungary I.: The Tokaj-Zemplén Mountains.** *Mikológiai Közlemények, Clusiana* 52(1-2): 65-78.
- Bratek Z., Merényi Zs., Varga T. 2013. **Changes of hypogeous funga in the Carpathian-Pannonian region in the past centuries.** *Acta Mycologica* 48:33–39. doi: 10.5586/am.2013.005.
- Siller I., Kutszegi G., Takács K., Varga T., Merényi Zs., Turcsányi G., Ódor P., Dima B. 2013. **Sixty- one macrofungi species new to Hungary in Őrség National Park.** *Mycosphere* 4:871–924. doi: 10.5943/mycosphere/4/5/3.